

B型肝炎ウイルスコア抗原の生化学的性状について

著者	山木 光男
号	869
発行年	1982
URL	http://hdl.handle.net/10097/19406

氏 名 (本籍) やま き みつ お
山 木 光 男

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学位記番号 医博第 869 号

学位授与年月日 昭和 57 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科
(博士課程)病理学系専攻

学位論文題目 Circular Dichroic and Biochemical Properties
of Hepatitis B Virus Core Antigen
（B型肝炎ウイルスコア抗原の生化学的性状に
ついて）

(主 查)

論文審査委員 教授 石田 名香雄 教授 菊地 吾郎

教授 山 根 績

論 文 内 容 要 旨

B型肝炎ウイルス (HBV) コア粒子は、ほぼ単一ポリペプチドがDNAを高度にパッキングして生じた核酸-タンパク質複合体と考えられる。機能分化を遂げた他のウイルスでは、キャプシドタンパク質と核酸のパッキングタンパク質が異なるものであることが通常である。HBVコア粒子径を約30nmとすると、単純に計算すると約25のDNA packing ratioが求められる。これはHistoneによるヌクレオフィラメント構造の約7に比べ、より密にDNAがパッキングされていることを示唆している。このような単一タンパク質による密なDNAのパッキングは他に、精子核におけるプロタミンのDNAパッキングが知られている。ここで興味深いことには、遺伝子工学によるHBVゲノムの解析から予測されるHBVコアタンパク質の部分構造が、ある種のプロタミン、すなわちニワトリ精子核のガリンというタンパク質と共通であることが知られている。機能が単なる構造維持だけではないヒストンタンパク質群に比べ、単純機能のタンパク質であるプロタミンと共通構造を持つということは、この共通構造にDNAの高度パッキングのメカニズムが存在すると考えられる。このような観点から、本研究ではHBVコアタンパク質の分離精製を行ない、その生化学的性状を明らかにすることを目的とした。コア粒子は、剖検肝を出発材料として精製した。精製法は、ショ糖ステップワイズ密度勾配遠心、ゲル濾過法 (セファロース4B)、更に最終段階で、ハイドロオキシアパタイトカラムクロマトグラフィーによる精製を行なった。この精製コア粒子を以下の実験に供した。最初に、コア粒子構成タンパク質の分子種を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により調べたところ、分子量約21,000の主要タンパク質と極めて微量に存在する分子量43,000のタンパク質が再現性よく、精製法を変えても (例えば、ゲル濾過後、抗コア粒子抗体によるHBVコア粒子の沈降) 検出された。更に、同じ電気泳動系のスケールを大きくして調製したコアタンパク質 (分子量21,000) のアミノ酸分析を行なった結果、ヒストン、プロタミンなどと同じように、塩基性アミノ酸を多く含むことが明らかになった。C末端分析ではトリチウムラベル法を用いた結果、システインがC末端アミノ酸と同一と定された。一方N末端分析には、ダンシル-エドマン法を用いた。加水分解中、酸分解され易いアミノ酸の存在も考えられるため、エドマン分解を2段以上行ない、それぞれのN末端分析をダンシル法で行なったところ、いずれの場合もダンシル-ε-リジン及びダンシル-O-チロシンはかなりの蛍光強度で観察されたが、N末端由来のダンシル誘導体は見い出されなかった。このことから、N末端アミノ基が何らかの修飾を受けている可能性が考えられる。以上の結果と、HBVゲノムのDNA配列決定の報告において予測されたHBVコアタンパク質の性状は一致していた。更にコアタンパク質の性状を分光学的方法により解析した。予備的解析として、タンパク

質の二次構造の予測法をHBV DNAより予測されるコアタンパク質に適用したところ、以下のいくつかの特徴が予測された。1) β -turn 構造を多く (48%) 含んでおり、更にそのうち三分の一が連続的に (α -helix や β -sheet 構造に中断されることなく) 存在している。2) この β -turn 構造に比べ、他の二つの構造、すなわち α -helix と β -sheet は一次構造上、それぞれN末端と内部領域上に局在している。3) HBV のサブタイプ間でアミノ酸変異が起きてはいるが、大きな構造変化を起こすような変異は生じていない。

分光学的方法として、単離HBV コア粒子のCDスペクトルを二つの条件下で測定、解析を行ない、次のような結果を得た。1) 生理食塩水でのCDパターンには、 α -helix β -sheet 構造の寄与が認められるが、その $[\theta]$ 値の負の程度は通常に比べ小さい。2) 11M酢酸処理後のコアタンパク質の1 mM酢酸におけるCDスペクトルは、通常のタンパク質では認められないパターンであり、Woody らが理論的に算出した β -turn のスペクトルと非常に似ていた。3) CD 曲線の解析は、 β -turn 及び random coil など標準スペクトルが未だ知られていない構造を多く含む場合正確に行なえない。

このようにコアタンパク質は、通常のタンパク質に認められない分光学的特徴を備えている。 β -turn 構造は、ある種のタンパク質には多量含まれていることが知られているが、この予測コアタンパク質のように一ヶ所に連続的に存在するものではない。この β -turn の clustering が、 β -turn 自身の安定化を促し、その結果コアタンパク質のCD測定において、 β -turn スペクトルの検出を可能にしたものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文はB型肝炎ウイルス（HBV）の最小感染単位であるコア粒子について、特に蛋白化学的な観点から解析し、その特徴を他のDNAをパッキングした蛋白（例えば精子や他のウイルス）と比較し、HBVの特徴を描こうと試みた論文である。

先ず第1に剖検肝を出発材料として、ほぼ結晶状に配列したコア粒子を得たが、これは著者の経験でCsClなどの塩類溶液中では粒子が容易に崩壊することからこれを避け、蔗糖密度勾配遠心、ゲル濾過、ハイドロキシアパタイトなどを組合わせて用いることにより達成されたものである。

第2に従来知られた分子量21,000の蛋白以外に分子量43,000の蛋白が微量存在することを明確にした。

第3に分子量21,000の蛋白のアミノ酸を分析し、C端がシステインであること、N端アミノ基は修飾されているらしく、ダンシル誘導体の見い出されないことを明らかにした。なおウイルスゲノムのDNA配列の報告から予測される蛋白質の性状と分子量21,000の分離蛋白の性状とはアミノ酸分析の誤差範囲内では完全に一致した。

第4にコア粒子のCDスペクトルから、殊に1M酢酸処理の蛋白が β -turnスペクトルをとる事を明らかにし、Chang等の方法に従って予測した二次構造の特徴と一致することを示した。この様な構造はC端近くに存在し、その部分のアミノ酸配列はニワトリ精子中に含まれるガリンと類似する。 β -turnのClusteringが β -turn自身を安定化するものと著者は推定した。

以上HBVのコア蛋白の蛋白質化学的性状を明らかにし得た点、学位授与に値するものと認める。